

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-317092

(43)Date of publication of application : 26.12.1988

(51)Int.Cl.

C12P 7/66

//(C12P 7/66

C12R 1:01)

(21)Application number : 62-151059

(71)Applicant : MITSUBISHI GAS CHEM CO INC

(22)Date of filing : 19.06.1987

(72)Inventor : URAGAMI SADAJI
KOGA HIROMI

(54) PRODUCTION OF COENZYME Q10

(57)Abstract:

PURPOSE: To readily, efficiently and stably obtain a coenzyme Q10 useful in a medicine such as heart function-accentuating agent, feed additives, etc., by extracting a bacterium cell obtained by cultivating a coenzyme Q10 producing bacterium belonging to the genus Oligomonas.

CONSTITUTION: A bacteria cell is separated and selected from a soil, etc., in a culture medium containing methanol to afford Oligomonas methanolica strain exhibiting the following bacteriological and physiological properties: Shape and size of the cell: cocci or short rods, wide, 0.5W0.8 μ m, length, 0.5W1.5 μ m; Gram negative; capable of rearing and propagating in alkaline conditions; capable of reducing nitrate; capable of assimilating glucose and methanol, etc. Then the strain is aerobically cultivated in a culture medium containing about 6wt.% methanol, peptone, etc., at 20W42° C, pH7W10 and 0.5W20ppm dissolved oxygen concentration. Then a bacterium cell is separated from the culture medium and dried and the resultant dried bacterium cell is heated with ethanol, etc., at 50W90° C for about 1hr to provide an extract, which is fractionated with silica gel, etc., and purified to liberate the aimed coenzyme Q10.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

② 日本国特許庁 (JP)

③ 特許出願公開

④ 公開特許公報 (A) 昭63-317092

⑤ Int.Cl. 4

C 12 P 7/66
K C 12 P 7/66
C 12 R 1:01

識別記号

序内整理番号

⑥ 公開 昭和63年(1988)12月26日

A-7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑦ 発明の名称 極醇素Q₁₀の製造法

⑧ 特 願 昭62-151059

⑨ 出 願 昭62(1987)6月19日

⑩ 発明者 清上 貞治 新潟県新潟市太夫浜字新削162番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

⑪ 発明者 木我 浩美 新潟県新潟市太夫浜字新削162番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

⑫ 出願人 三菱瓦斯化学株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑬ 代理人 乔理士 小堀 貞文

明細書

1. 発明の名称

極醇素Q₁₀の製造法

2. 特許請求の範囲

オリゴモテス属に属する極醇素Q₁₀生産細菌を培養して菌体を得、得られた菌体から極醇素Q₁₀を分離、回収することを特徴とする極醇素Q₁₀の製造法

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、極醇素Q₁₀の製造法に関するものである。本発明では、微生物を用いた極醇素Q₁₀の製造法について述べる。

極醇素Q₁₀は、生体内の未梢呼吸系の電子伝達体として重要な役割を果たし、心臓臓器充血剤、腎虚無力筋弛緩剤、肺気管治療薬、再生不良性貧血治療薬および円形脱毛症治療薬などの医薬品ならびに飼料添加剤などとして有用な化合物として知られている。

従来、極醇素Q₁₀は、動物および植物などのそれらの組織から抽出され、さらに、精製することにより製造されており、品質の一貫性に問題があり、また、原料の供給が不安定であった。

このような欠点を避けるための一方法として、最近では、微生物を培養して得られた菌体から極醇素Q₁₀を抽出する方法が知られている。

しかしながら、微生物の極醇素Q₁₀の生産性は、実験上供するには、まだ、充分ではなく、極醇素Q₁₀の生産性の大きい微生物の発見が期待されている。

本発明は、微生物を使用し、効率よく極醇素Q₁₀を製造する方法を提供することを目的とする。

(問題を解決するための手段、作用)

本発明者らは、極醇素Q₁₀を多量に生産する菌株を見出すべく研究を重ねた結果、オリゴモテス属に属する菌株が、その菌体内に多量の極醇素Q₁₀を多量に生産、蓄積することを見出し、本発明に

特開昭63-3170B2 (4)

「Section 4 の Gram-Negative Aerobic Rods and Gocci」に含まれるものと考えられる。このSectionには、37の属が記載されている。本細菌をこれらの属と比較すると、球菌または短桿菌であり、運動性がない、CC含量の点から、*Paracoccus*属に近いといえる。しかしながら、本細菌は、脱窒能がない点から*Paracoccus*属についての属種と一致しない。また、*Paracoccus*属に属する菌種としては、*P. denitrificans* と *P. halodenitrificans* とが存在するが、これらの菌種とは脱窒能および生育性の点で異なる。

従って、本発明者らは、本細菌を無菌に保させることとして、オリゴモナス (*Oligomonas*) 属と命名し、また、固體としてオリゴモナス メタノリカ (*Oligomonas methanolicus*) と命名した。

本発明において、菌学的性質を調べるために実験方法は、前記のバージィズ マニュアル、産科学研究所学友会編「細菌学実習要領」(1968) および長谷川 誠治 編著「微生物の分類と同定」(1975) に準拠した。

炭素源としては、本細菌が質化し得る炭素源であれば特に制限はないが、メタノールのほかにエタノールなど含炭素源を好適に使用し得るが、その他の炭素源へたとえば、精餾、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、キシロース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類、フルビトール、マンニトールおよびイノシトールなどの糖アルコール、また、こはく酸などの有機酸なども使用することができる。これらのうち、工業用の醸酵原料としては、メタノールが最も好ましい。培地におけるこれらの炭素源の濃度は、炭素源の種類により適宜選択される。たとえば、炭素源がメタノールの場合には、培地または培養液のメタノール濃度は5重量%以下が好ましく、菌の生育および培地の浸透圧から3重量%以下が特に好ましい。

窒素源としては、たとえば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および/または、たとえば、尿素、コーン・スティア・リカ、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有

せん、メタノール含有寒天平板培地、メタノール含有寒天斜面培地として次の組成の培地を用いた(実施例でも同様)。すなわち、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KH_2PO_4 1.4 g, Na_2HPO_4 2.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{NaCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg およびディフコ (Difco) 社製寒天 (パクトアガー Bacto-agar) 15 g を純水 1 L に溶解し、1 kg/cdC で20分間煮沸したのち10重量% Na_2CO_3 水溶液を漸減的に加え、pHを9.0に調整した。また、さらにメタノール 8 ml を無菌的に添加して、平板培地または斜面培地を作成した。また、メタノール含有液体培地としては、前記の培地において寒天を添加しないものを用いた。

土壤からの本細菌の分離は、前記のメタノール含有培地を用いる常法で行った。

本細菌の培養に使用する培地は、本細菌が変化し得る炭素源を含有していることを要し、さらに適量の窒素源および類似物などを含有する培地ならば合成培地および天然培地のどちらでもよい。

窒素素含有物が用いられる。

また、無機成分としては、たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、りん酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、モリブデン塩、コバルト塩、ほう素化合物およびよう素化合物が用いられる。

さらに、アミノ酸、核酸、ビタミン、酵母エキスおよび発芽エキスなどの生育促進物質も使用される。

また、使用される細菌が、栄養要求性を示す場合には、その要求物質を存続させる必要がある。

培養条件は、温度20~42°C、好ましくは25~40°C、pH 7~10、好ましくは7.5~9.5である。このような条件で好気的に培養を行う。これらの条件をはずして培養した場合には、本細菌の増殖は比較的悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを防げない。

また、培養液の總存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、0.5~20ppm が好ましい。そのために、通気量を調節したり、攪拌したり、通気ガ

特開昭63-317092 (5)

スとして酸素もしくは酸素と空気との混合ガスを使用したり、また、培養槽内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、固分培養または液体培養のいずれでもよい。

電着鍍としてアンモニウム塩を使用した場合には、培養期間中にアンモニアが固体生産のために消費されて培養液のpHが低下する。この場合に、培養液のpHを前述の態に保つために、アンモニア、苛性カリおよび苛性ソーダなどのアルカリを添加するが、アンモニアを添加することが好ましい。

このようにして、細菌を培養したのち、菌体を培養液から分離する。分離には通常の固液分離手段が採用される。すなわち、固液分離手段としては、たとえば、培養液そのものをそのまま適心分離するとの手段、培養液中に本細菌よりも大きい他の微生物を濾過剤として加えたり、または、プレコートすることにより培養液から菌体を濾過分離するとの手段、培養液に懸々の凝集剤を加えて菌体を凝集させて、この凝集菌体を濾過もしくは適心分離により培養液から分離するとの手段、

培養液のpHを5以下にすることにより、または、pHを5以下にさらに50~100°Cで加熱することにより固体を凝集させて、この凝集固体を振過もしくは遠心分離により培養液から分離するとの等のなどを適用し得る。

分離された皮膚の固体、または、たとえば、嗜
菌乾燥などによる乾燥固体から糖酵素 Q_{10} を抽出
し、この糖酵素 Q_{10} は必要に応じてさらに精製に
付される。

抗酵素Q₁₀の分離、抽出および精製は、補酵素Q₁₀に適用されている通常の分離抽出法および精製法によって行なうことができる。すなわち、たとえば、エタノール、メタノールもしくはアセトンに固体を懸濁させて、50~90°Cで1時間加熱して抽出して抽出液を得る。または、まず、メタノール、水酸化ナトリウムおよびピロガリールの混合物を用いて、菌体中のりん脂質などのけん化性物質をけん化してけん化液を得る。これらの抽出液もしくはけん化液から、たとえば、カルベキサンのような青黙根によって補酵素Q₁₀を抽出し

て抽出物を得る。ついで、この抽出物から、たとえば、ハイポーラスポリマーのような多孔性合成樹脂、シリカゲルおよびフロリジルなどを用いて、精製を目的を分別、精製し、精製する。

菌体から得られた核酸類¹⁾の同定、定量には、一般に、高速液体クロマトグラフィー、元素分析、融点測定、赤外部吸収スペクトル、紫外外部吸収スペクトル、差確共鳴スペクトルおよび質量分析などの手段がそれぞれ用いられる。

(宿 脱 阴)

実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。なお、本発明は、実施例に限定されるものではない。

实施例 1

カリゴモナス ノタノリカの固体の分解

土壤サンプル約 0.5~1g を殺菌水10mlに無菌的に入れ、この懸濁液 1mlをメタノール含有寒天平板培地上に漬けがほば一様になるように入れ、水分をこの寒天培地に吸収させたのち、28℃で約7日間静置培養を行なった。この寒天培地上に生

培したコロニーの一部分をさらにメクノール含有
第灭平板培地で培養して得られた單一コロニーを、
メクノール含有寒天斜面培地に植菌して培養して、
オリゴモナス メクノリカ 0-3、同 0-15 および
同 0-16A のそれぞれを風た。

標記録の整理

鰯水 120mlあたり、(NH₄)₂SO₄ 3g、KH₂PO₄ 1.8g、Na₂HPO₄ 2.1g、MgSO₄·7H₂O 0.2g、CaCl₂·2H₂O 38mg、FeCl₃·6H₂O·KH₂O 30mg、MnCl₂·4H₂O 5mg、ZnSO₄·7H₂O 5mg、CuSO₄·5H₂O 0.5mg、Na₂CO₃ 2.5g、ビオチン 2μgおよびメタノール 8mlを溶解し、pH 9.0に調整した培地（以下 培地A と記す）30mlを 100ml容三角フラスコに分注し、120℃で20分間殺菌した。寒天20g/lを添加したメタノール含有寒天培地（Na₂CO₃を含まない培地を120℃で20分間殺菌し、これに別に殺菌した10重量% Na₂CO₃水溶液を培地10mlあたり 0.25ml添加して作成した）で30℃、3日間培養したオリゴモナス メタノリカ 0-100（株工研菌寄第9282号）の1自倍耳毛 100ml容三角フラスコ中の培地Aに

特標題G3-317092 (6)

接種し、30℃でゼローカリー・シェーカーで回転数220回／分の振転無塗培養を行なった。この培養液を種母液とした。

工業用水 12 あたり、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g、 KH_2PO_4 4.5g、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 39mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 90mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15mg、 $\text{NaCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg、 $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg、 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg、 H_3PO_4 1.0mg、 NaCl 50mg、 KI 1.0mg およびビオチン 80mg を含む培地（培地 B）15g を 30×8 寸培養瓶に入れ、殺菌後、アンモニア水で pH 9.0 に調整し、メタノール 40ml および種母液 200ml をそれぞれ添加した。細菌が増殖するに従って、培養液中のメタノール濃度が低下したが、このメタノール濃度をガスクロマトグラフィーで分析し、培養液中のメタノール濃度が 0.1~0.2 重巻³ になるようメタノールを補給した。培養温度 30℃、培養液の pH 9.0、振搗率の回転数（振搗羽根の半径 71mm）500 回／分および通気量 1vml で通気（空気を使用）振搗培養を行なったところ、世代時間

が約4時間で細胞が増殖した。培養を開始してから、48時間後に、培養液を遠心分離し、得られた菌株を菌糸乾燥して乾燥菌体90gを得た。

この乾燥菌体から補酵素Q₁₀を、イソプロパノール濃度が90容量%のイソプロパノール水溶液で抽出し、ついで、ヘキサン溶液を行ない、得られたヘキサン溶液中の直元型補酵素Q₁₀を酚酸鉄で酸化した後、このヘキサン溶液について、高速液体クロマトグラフィーで補酵素Q₁₀を同定し、その含量を測定した。その結果から、乾燥菌体にはあたり 1.60 mg の補酵素Q₁₀が得られたことになる。

(発明の効果)

本発明によれば、工業生産により安定して容易に入手し得る物質をも原料として使用することができ、さらに、細菌を使用して、補酵素Ⅱ₁を容易に、効率よく、しかも、安定して製造することが可能となる。

また、特に、本発明における細胞は、酵アルカリ性細胞なので培養における細胞による汚染が發

しく察視される。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社
代表者 永野和吉
代理人 井澤士小屋貞文